

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Patentschrift
⑩ DE 44 45 769 C 1

⑤① Int. Cl. 6:
A 01 N 1/00
A 61 L 2/16

②① Aktenzeichen: P 44 45 769.3-41
②② Anmeldetag: 21. 12. 94
④③ Offenlegungstag: —
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 9. 11. 95

DE 44 45 769 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:
Biochrom KG, 12247 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Feiler und Kollegen, 81675 München

⑦② Erfinder:
Frenzel, Bernd, Dr., 12209 Berlin, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
EP 03 53 345 A2
WAHLBERG, J.A.: Cryobiology 23(1986), S. 477-482;
COLLINS, G.M. et.al.: Lancet, 1969(6 Dec.),
S. 1219-1222;
MINCHENKO, A. et.al.: Lab. Invest. 71(3)1994,
S. 374-379;
ZDOLSEK, J.M.: APMIS, 101(2)1993, S. 127-132;
KOMATSU, Y.: Agr. Biol. Chem. 35(9)1971,
S. 1328-1339;

⑤④ Protektionsmedium zum Aufbewahren vitaler Gewebe, insbesondere von Zähnen

⑤⑦ Beschrieben wird ein antibiotikumfreies, Nährstoffe für ein Gewebewachstum enthaltendes Protektionsmedium, das als Kontaminationsschutz ein kein Antibiotikum darstellendes Konservierungsmittel enthält, ein Verfahren zur Herstellung desselben sowie die Verwendung desselben zur Aufbewahrung von vitalem Gewebe.

DE 44 45 769 C 1

Die Erfindung betrifft allgemein ein Protektionsmedium zur Aufbewahrung vitaler Gewebe, wie zum Beispiel ausgeschlagener Zähne, das in bereits vorgefertigter Form in einem Behälter vertrieben werden kann. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Protektionsmedium, welches in flüssiger Form mindestens ein Jahr haltbar ist und einen Schutz gegen unerwünschte Kontaminationskeime aufweist.

Für die Transplantation von Organen des Menschen und der Tiere sind Protektionsmedien entwickelt worden. Diese Protektionsmedien sind sehr unterschiedlich zusammengesetzt, ihnen ist jedoch gemeinsam, daß sie meist eine rasche Blutarmut bei Organtemperaturen von 0–10°C herbeiführen sollen. Dies Prinzip der hypothermen Ischämie hat sich im Bereich der Kliniken bewährt. (J. A. Wahlberg, J. H. Southard und F. O. Belzer, *Cryobiology*, 23, 477–482 (1986) "Development of a cold storage solution for pancreas preservation", G. M. Collins, M. B. Bravo-Shugartman und P. I. Terasaki, *Lancet*, 1219–1222 (1969)).

Beispiele für solche Protektionsmedien sind die Euro-Collins-Lösung oder die University Wisconsin (UW)-Lösung. Protektionsmedien außerhalb des klinischen Bereichs werden zum Beispiel für die Aufbewahrung eines bei einem Unfall herausgebrochenen Zahnes benötigt. Die Aufbewahrung in einem Nährmedium erweist sich als notwendig, da sonst das an der Zahnwurzeloberfläche anhaftende vitale Gewebe innerhalb kurzer Zeit austrocknet und seine Regenerationsfähigkeit verliert. Durch die Lagerung eines Zahnes in einem speziellen Protektionsmedium ist es möglich, den Zahn auch nach 8 bis 12 Std. zu reimplantieren.

Ein solches Medium muß einen Kontaminationsschutz aufweisen, da ein ausgeschlagener Zahn in der Regel mit allerlei Bakterien und Pilzen kontaminiert ist. Ein Versuch zur Entwicklung eines solchen Mediums ist in der EP-A2 03 53 345 beschrieben. Dabei wird in einem sehr aufwendigen Behälter das Trockenmedium getrennt vom Lösungsmittel (Wasser) aufbewahrt und bei Bedarf aufgelöst. Der Kontaminationsschutz wird durch Zugabe von Antibiotika und Fungiziden erreicht. Bei dieser Lösung kommt es aber zum Verklumpen und Verderb des außerordentlich hygroskopischen Trockenmediums nach wenigen Wochen. Dadurch ist eine ordnungsgemäße Auflösung des Trockenmediums für den Gebrauch nicht mehr gewährleistet bzw. es kommt durch den Verderb des Mediums zur Schädigung des aufzubewahrenden Gewebes. Die für den Kontaminationsschutz eingesetzten Antibiotika und Fungizide erlauben darüber hinaus nur eine sehr begrenzte Anwendung im Rahmen der ärztlichen Verschreibungspflicht. Ferner ist stets die Gefahr von Allergien gegen Antibiotika gegeben. Die ubiquitäre Vorratshaltung ist somit ausgeschlossen.

Natriumazid (NaN_3) wurde bereits in Zellkulturen eingesetzt und erwies sich hierbei als Inhibitor einer oxidativen Phosphorylierung (A. Minchenko et al "Lab. Invest." 71 (3), 374–379 (1994)), als Schutz gegen einen durch Acridinorange und Blaulicht induzierten Verlust der Lebensfähigkeit von Zellen (J. M. Zdolsek "APMIS" 101 (2), 127–132 (1993)) bzw. als die Showdomycinaufnahme von E. coli K-12 Zellkulturend beeinflussend (Y. Komatsu "Agr. Biol. Chem." 35 (9), 1328–1339 (1971)).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist folglich, ein antibiotikumfreies, Nährstoffe für ein Gewebewachstum enthaltendes Protektionsmedium bereitzustellen, das als Kontaminationsschutz ein kein Antibiotikum darstellendes Konservierungsmittel enthält.

Aufgabe der Erfindung ist ferner, für eine möglichst lange, z. B. einjährige Haltbarkeit dieses Protektionsmediums in vorgefertigter Form zu sorgen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein antibiotikumfreies, Nährstoffe für ein Gewebewachstum enthaltendes Protektionsmedium, das als Kontaminationsschutz bzw. Konservierungsmittel Natriumazid (NaN_3) in einer Menge von 5 bis 60 mg/l enthält.

Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen beschrieben.

Bei der Zubereitung eines erfindungsgemäßen Protektionsmediums werden die Bestandteile in einem Lösungsmittel unter keimfreien Bedingungen vermischt.

Vorgesehen ist insbesondere, das erfindungsgemäße Protektionsmedium zur Aufbewahrung von vitalem Gewebe, insbesondere Zähnen, zu verwenden.

Das erfindungsgemäße Protektionsmedium enthält im Gegensatz zu den eingangs beschriebenen Protektionsmedien eine Vielzahl notwendiger Nährstoffe, um eine Aufbewahrung des Gewebes bei Raumtemperaturen, also mit Stoffwechsel, zu ermöglichen. Der für die Haltbarkeit eines solchen Nähr- und Protektionsmediums kritischste Inhaltsstoff ist das notwendige L-Glutamin. Es zerfällt bei Raumtemperatur in kurzer Zeit. Dabei entsteht giftiges Ammoniak. Das üblicherweise verwendete L-Glutamin wurde deshalb in dem erfindungsgemäßen Protektionsmedium durch das Dipeptid N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (ac-Ala-Gln) ersetzt. Dieses ist stabil und außerordentlich lange haltbar. Statt des hier beschriebenen Dipeptids können selbstverständlich auch andere Dipeptide oder längere Peptide des L-Glutamins verwendet werden. Die Herstellung eines erfindungsgemäßen nährstoffhaltigen Protektionsmediums erfolgt beispielsweise durch Vereinigen der Bestandteile in einem Lösungsmittel, z. B. destilliertem Wasser, unter keimfreien Bedingungen. Unter dem Ausdruck "keimfreie Bedingungen" ist dabei zu verstehen, daß entweder die Ausgangsmaterialien keimfrei sind oder das Protektionsmedium nach einem Vereinigen der Bestandteile in üblicher bekannter Weise, beispielsweise durch Filtration durch ein Bakterienrückhaltefilter, keimfrei gemacht wird. Dabei können die folgenden Bestandteile enthalten sein (Mengen in mg/l). Mögliche Konzentrationsbereiche sind beispielsweise in der rechten Spalte angegeben. In dem erfindungsgemäßen Protektionsmedium können jedoch einzelne Komponenten weggelassen werden.

INHALTSSTOFF	KONZENTRATION	BEREICH	
NaCl	6000	5000-8000	
KCl	400	200-500	
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1512	1000-2000	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100	40-200	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100	60-120	
D-Glucose	2000	500-4000	10
Phenolrot	5	1-10	
NaHCO ₃	4000	1500-7000	
L-Arginin	200	100-300	
L-Asparagin	50	10-100	15
L-Asparaginsäure	20	5-50	
L-Gystin	50	10-100	
N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	519	100-1000	
L-Glutaminsäure	20	5-40	20
Glycin	10	5-20	
L-Histidin	15	5-30	
L-Hydroxyprolin	20	5-40	25
L-Isoleucin	50	10-100	
L-Leucin	50	10-100	
L-Lysin·HCl	40	10-100	
L-Methionin	15	5-30	30
L-Phenylalanin	15	5-30	
L-Prolin	20	5-40	
L-Serin	30	10-60	35
L-Threonin	20	5-40	
L-Tryptophan	5	1-10	
L-Tyrosin	20	5-40	
L-Valin	20	5-40	40
L(+) Ascorbinsäure	5	1-100	
Glutathion	6	1-10	
Biotin	0,2	0,01-2	
Vitamin B ₁₂	0,005	0,001-1,01	45
D-Ca-Pantothenat	0,25	0,1-0,4	
Cholinchlorid	3	1-5	
Folsäure	1	0,5-3	50
i-Inosit	35	10-50	
Nicotinamid	1	0,1-5	
p-Aminobenzoessäure	1	0,1-5	
Pyridoxin·HCl	1	0,1-5	55
Riboflavin	0,2	0,02-0,8	
Thiamin·HCl	1	0,1-5	
NaN ₃	30	5-60	60

Der besonders günstige Konzentrationsbereich für das Konservierungsmittel Natriumazid liegt bei 20 bis 40 mg/l.

Zu allen bisher bekannten Nährmedien, die in der Zellkultur Verwendung finden, werden Antibiotika als Kontaminationsschutz zugegeben (R.I. Freshney, Animal Cell Culture, Oxford University Press, ISBN 0-19-963 212-8). Überraschenderweise zeigt sich, daß auch der antimikrobielle Wirkstoff Natriumazid in der Zellkultur toleriert wird. Die Zellen überleben nicht nur in Anwesenheit von Natriumazid, sie sind erstaunlicherweise sogar in der Lage, sich zu teilen und zu wachsen. Im folgenden Versuch wurden zu einer gleichen

Anzahl von Hs68-Zellen zur Kontrolle das oben beschriebene Protektionsmedium ohne NaN_3 mit einem Zusatz von 10 Prozent fetalem Kälberserum gegeben. In einer anderen Versuchsreihe wurde der Konservierungsstoff Natriumazid (NaN_3) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen im Brutschrank mit 5 Prozent CO_2 wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und das Zellwachstum durch Messung der erreichten OD-Werte im ELISA-Reader ermittelt.

Die folgenden Konzentrationen des Konservierungsmittels, die eine Konservierung gestatten, wurden verwendet:

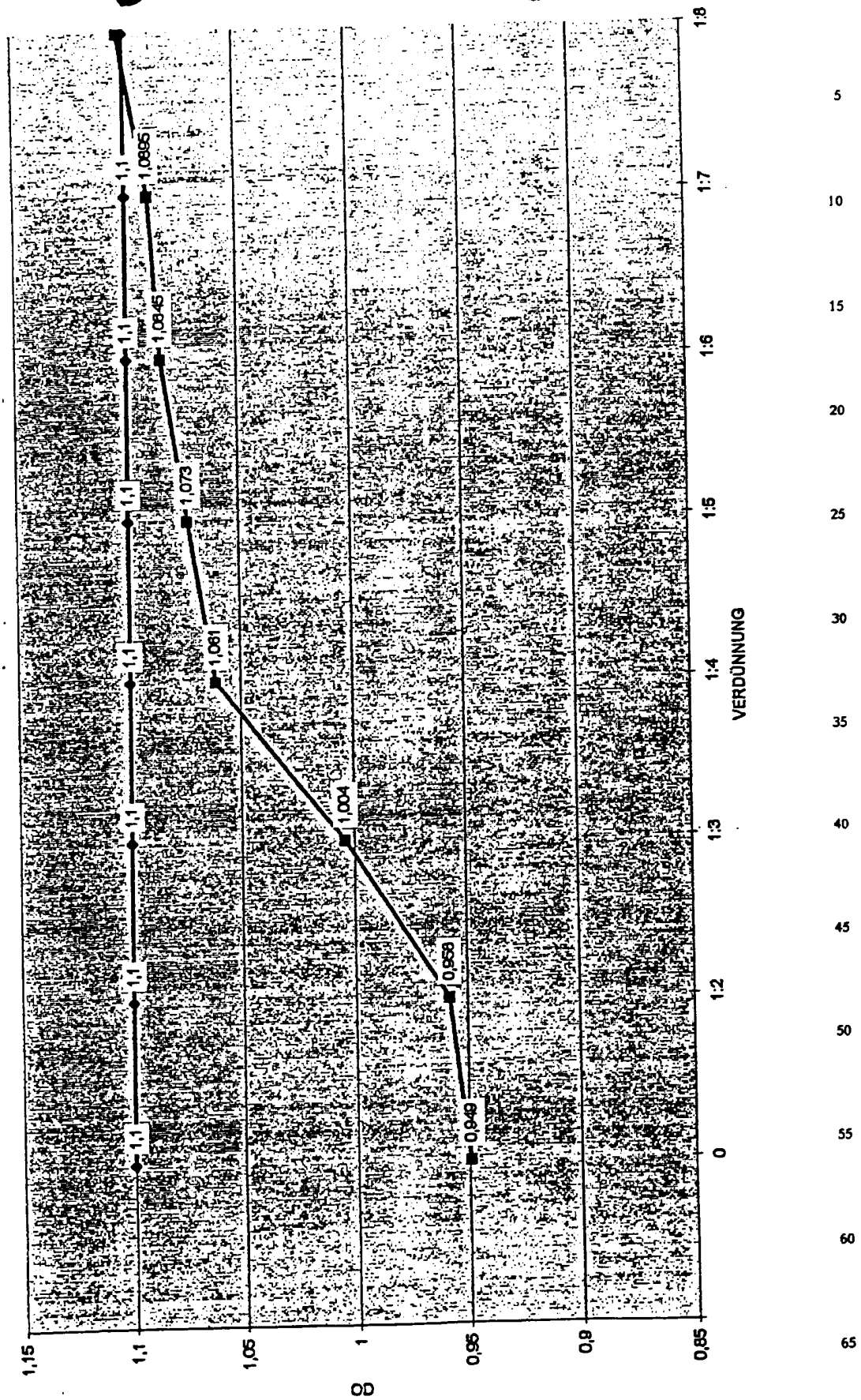
	Verdünnungsstufen	Natriumazid mg/l
10	0	40,00
	1:2	20,00
	1:3	13,33
15	1:4	10,00
	1:5	8,00
	1:6	6,67
	1:7	5,71
20	1:8	5,00

Das Versuchsergebnis zeigt, daß Natriumazid überraschenderweise ein Wachstum der Zellen gestattet (vgl. Abbildung 1).

	KONTROLLE	NATRIUMAZID OD
25		
30	0	1,1
	1:2	1,1
	1:3	1,1
35	1:4	1,1
	1:5	1,1
	1:6	1,1
40	1:7	1,1
	1:8	1,1
		0,949
		0,958
		1,004
		1,061
		1,073
		1,0845
		1,0895
		1,1025

Die Haltbarkeit eines solchen Nährmediums wurde mittels der Zellkultur überprüft. Die zellerhaltenden wachstumsfördernden Eigenschaften wurden gegenüber einer Kontrolle festgelegt und der Versuch nach einer Lagerung von 18 Monaten bei Raumtemperatur wiederholt. Dabei zeigte sich, daß die zellerhaltenden und wachstumsfördernden Eigenschaften des Mediums auch nach 18 Monaten unverändert gut waren.

ABBILDUNG 1 ZELLKULTURWACHSTUM MIT NATRIUMAZID



Patentansprüche

1. Antibiotikumfreies, Nährstoffe für ein Gewebewachstum enthaltendes Protektionsmedium, das als Kontaminationsschutz bzw. Konservierungsmittel Natriumazid (NaN_3) in einer Menge von 5 bis 60 mg/l enthält.
2. Protektionsmedium nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das NaN_3 in einer Menge von 20 bis 40 mg/l und vorzugsweise in einer Menge von 30 mg/l vorhanden ist.
3. Protektionsmedium nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es stabiles L-Glutamin in Form eines Peptids, insbes. N-Acetyl-L-Alanyl-C-Glutamin enthält.
4. Protektionsmedium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Aufbewahrung von vitalem Gewebe, insbesondere von Restgewebe an Zähnen, geeignet ist.